Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert-Koch-Institutes Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

GIBT ES NACH HOCHDOSIERTER, ORALER IMPFUNG MIT SALMONELLA TYPHI MURIUM – ANTIGEN EINE IMMUNPARALYSE?

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehem.
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1970

vorgelegt von
Klaus Kohlschmidt
aus Berlin

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert Koch-Institutes Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

GIBT ES NACH HOCHDOSIERTER, ORALER IMPFUNG MIT SALMONELLA TYPHI MURIUM - ANTIGEN EINE IMMUNPARALYSE?

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
ehem. Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Klaus Kohlschmidt
aus Berlin

ehem. Dekan: Professor Dr. med. Herbert L a x

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen R a e t t i g

Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. September 1970

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	Einleitung	3
B.	Aufgabenstellung	5
C.	Material und Methoden	7
	1. Versuchstiere	7
	2. Impfstoff	7
	3. Immunisierung	8
	4. Infektion	8
D.	Begriffsbestimmung	10
E.	Beschreibung der Versuche	14
F.	Diskussion	22
G.	Zusammenfassung	25
H.	Literatur	26
	Lebenslauf	

A. EINLEITUNG

Die orale Immunisierung wird im Gegensatz zur parenteralen Immunisierung zu den sogenannten lokalen Impfungen gerechnet. Sie geht bis auf die klassischen Experimente PAUL EHRLICHS (1891) zurück und ihre Wirksamkeit ist in der Folgezeit an zahlreichen Modellen im Tierexperiment nachgewiesen worden, die zeigten, daß sie weitgehend spezifischen Schutz erzeugt (8).

Bei der oralen Immunisierung beschränkt sich die Antigen-Antikörperreaktion zunächst vorwiegend auf die Schleimhautzellen des Darmtraktes.
Daher findet man nach oraler Impfung auch bei den Tieren viel seltener eine so regelmässige und quantitative Antikörperbildung bei den serologischen Untersuchungen wie nach parenteraler Antigenzufuhr. Es ist jedoch bekannt, daß auch ein guter Schutz ohne Antikörper im strömenden Blut auftreten kann, sodaß die Messung der Antikörper hier nichts Sicheres über den Impferfolg aussagt. So findet man beispielsweise nach oraler Immunisierung zunächst sehr niedrige Titer im Blut der geimpften Mäuse, werden

diese Tiere anschließend infiziert, so steigen ihre Titer in kurzer Zeit jedoch auf hohe Werte an (14, 24).

Daher wird bei den folgenden Versuchen auf serologische Untersuchungen verzichtet und allein die Mortalität nach Infektion auf natürlichem Wege als Grundlage der statistischen Auswertung benutzt.

B. AUFGABENSTELLUNG

Bei der gestellten Aufgabe beschäftige ich mich mit der oralen Immunisierung von NMRI (Naval Medical Research Institute) Mäusen mit nicht vermehrungsfähigem, hitzeinaktiviertem Antigen aus S.typhi murium-Bakterien. Es sollte geklärt werden, ob es bei übergroßen oralen Antigendosen zu einer Immunparalyse der Tiere kommen würde. Grundlagen waren die Arbeiten über orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung des Robert-Koch-Institutes Berlin (RAETTIG und Mitarbeiter, 20,21,22, 23).

Bei diesen Versuchen wurde von dem Modell der Enteritisinfektion der Maus durch S.typhi murium-Bakterien ausgegangen. Nach zunächst oraler Immunisierung der Mäuse wurden diese nach einer festgesetzten Zeit oral infiziert. Da alle Tiere gleichzeitig mit der Sonde infiziert wurden, und seit den Untersuchungen von TOPLEY bekannt ist, daß dann auch alle Tiere nach oraler Infektion erkranken(27), hätte man nach epidemiologischen Erfahrungen annahmen müssen, daß die resul-

tierende Summenkurve der täglichen Sterbefälle die ideale Form einer Explosionsepidemie hätte zeigen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall, sondern es trat übereinstimmend bei geimpften und nichtgeimpften Tieren der Typ einer Kontaktepidemie mit Vorschwankung, Gipfel und langsam abfallendem Schenkel auf.(20)

Hierbei tauchte die Frage auf, ob die Ursache für den langsamen Abfall des Impfschutzes während der zweiten und dritten Phase des Epidemieablaufes auf eine Überlastung der geimpften Tiere mit Antigen zurückgeführt werden könnte, d.h. ob es sich um eine immunologische Überlastung im Sinne der Immunparalyse handelte. Da bei oraler Antigenzufuhr eine Immunparalyse noch nicht beobachtet worden war, sollte dies in der jetzigen Versuchsreihe geprüft werden. Ich habe also versucht, von der normalen Immunisierungsdosis von 10^9 Keimen/ml Impfstoff ausgehend durch Erhöhung der 10er Potenzen bis auf 10^{12} Keime/ml eine Immunparalyse bei der Maus zu erreichen.

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die Versuche wurden mit NMRI-Mäusen der RKI-Zucht durchgeführt. Wir benutzten Tiere beiderlei Geschlechts (etwa 2/3 Männchen), mit einem Gewicht zwischen 16 und 20 g bei Versuchsbeginn. Während der Versuche blieben die Mäuse ohne jedes Umsetzen zu je 20 - 25 Tieren in Plastikkäfigen. Sie erhielten Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser. Unter den gleichen Bedingungen wurden die Kontrolltiere gehalten.

2. Impfstoff

Zur Impfstoffherstellung dienten fünf verschiedene Stämme von S.typhi murium (6616,6639,6643, 6656,6659). Die Bakterienkulturen wurden nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° Celsius von großen Agar-Schalen mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (pH = 7,2) abgeschwemmt. Die Inaktivierung erfolgte im Wasserbad 5 Minuten lang bei 100° Celsius (13). Der Titer des Impfstoffes wurde auf 10^9, 10^{10} und 10^{11} Keime/ml eingestellt. Bei 10^{12} Keimen/ml erhielten die Mäuse täglich die 10-fache Dosis von 10^{11} verteilt auf 3 Einzelgaben, weil diese Menge in einer Einzelgabe nicht mehr anwendbar war. Die Sterilität wurde in großen Ansätzen von flüssigem Nährboden besonders geprüft und vor jeder Einzelimpfung wie-

derholt, um irgendeine Infektion mit vermehrungsfähigen Bakterien zu vermeiden.

3. Immunisierung

Jede Maus erhielt täglich in der Zeit von Montag bis Freitag und nochmals in der darauffolgenden Woche Montag bis Freitag, also insgesamt an 10 Tagen, 0,25 ml des konzentrierten Impfstoffes mit der Sonde gefüttert. Jede Maus erhielt also während der Impfung 2,5 ml Impfstoff oder 2,5 x 10^9 bzw. die entsprechenden 10er-Potenzen inaktivierter Keime. Diese Impfung wurde bei allen Mäusen (auch bei der höchsten Dosierung 10,0 x 10^{11} inaktivierte Keime) ohne erkennbare Zeichen irgendeiner Gesundheitsbeeinträchtigung vertragen.

4. Infektion

Am 10. Tag nach der letzten oralen Immunisierung wurde jede immunisierte Maus und jede Kontrollmaus am gleichen Tage mit 0,25 ml eines virulenten Salmonella typhi murium-Stammes oral mit der Sonde infiziert und um eine relativ hohe etwa 60-7o%ige Mortalität bei den Kontrolltieren zu erreichen, wurde durch jeweilige Vorversuche auf eine entsprechende Virulenz des Infektionsstammes besonderer Wert gelegt. Den virulenten Infektionsstamm haben wir regelmäßig aus einer Kontrollmaus gewonnen, die im vorangegangenen Experiment gestorben war. Herzblut oder Milz dieses Tieres wurden direkt auf festem Agar-Nährboden ausgestrichen; die erste Abimpfung von dieser Platte Nährbouillon diente im allgemeinen

ohne Zwischenpassage nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C als Infektionsmaterial. Wenn im Vorversuch die Virulenz des Infektionsstammes jedoch, wie oben beschrieben, zu gering war, so wurde eine Tierpassage zur Erhöhung der Virulenz eingeschaltet.

D. BEGRIFFSBESTIMMUNG

Da die Begriffe Immuntoleranz und Immunparalyse (erstmalig von FELTON und Mitarbeitern als " immune paralysis " in der Literatur erwähnt) (9,10) fließend ineinander übergehen, soll zunächst eine kurze Erklärung der beiden Begriffe folgen:

Eine Immuntoleranz bedeutet, daß ein Organismus gegen ein Antigen keine Antikörper und keine Immunzellen bilden kann. Sie entsteht dadurch, daß der Makroorganismus meist in früher Jugend mit kleinen Antigendosen in Berührung gekommen ist. Diese Immuntoleranz kann durch verschiedenartige Antigene ausgelöst werden. Sie können in zellgebundener und in hochmolekularer Form oder als niedermolekulare chemische Verbindung vorliegen. Die Reichweite der Immuntoleranz ist durch ihre Spezifität begrenzt(26). Individuen, die gegenüber einem bestimmten Antigen (Tolerogen) immuntolerant sind, reagieren gegen jedes andere Antigen jedoch normal. Die Dauer der Immuntoleranz ist jeweils nur begrenzt (19,28).

Bei der Immunparalyse finden wir zwar ebenfalls

eine komplette Hemmung der Antikörperbildung, jedoch ist hierfür eine wesentlich größere als die üblicherweise immunisierende Dosis an Antigenen nötig (3,4), so beschreiben FELTON und Mitarbeiter, daß sie mit einer 500fach größeren als der üblicherweise immunisierenden Dosis von Pneumococcen-Polysaccharid beim erwachsenen Meerschweinchen eine langanhaltende und komplette Hemmung der Antikörperbildung erreichten. Ähnliche Versuche wurden von KERMAN und Mitarbeitern berichtet (11), die bei Nachkommen von normalen Mäusemuttertieren mit einer Immunisierungsdosis von 0,05 µg Pneumococcen Polysaccarid Typ III parenteral eine Immunisierung erreichten, während die 10fache Dosis eine Immunparalyse bewirkte. Gleichsinnig verliefen die Versuche bei Neugeborenen von paralysierten Müttern, die schon bei einer Dosis von 0,005 µg immunisiert und wieder mit der 10fachen Dosis paralysiert wurden.

Über ähnliche Versuche berichteten BROOKE und Mitarbeiter(1) sowie CLAMAN (2), die aber auch zeigten, daß sie unter bestimmten Bedingungen die Immunparalyse durch zusätzliche Gaben von Endotoxin aufheben konnten. MITCHISON (17,18) berichtete ergänzend, daß die Dauer der Erholungsphase nach Im-

munparalyse vom Alter der Makroorganismen abhängig ist; junge Tiere erholen sich schneller als ältere.

Hierzu gehört sicher auch die von MEDAWAR (16) beschriebene Überladungsparalyse, die auf Zellen zutrifft, die bereits zur Antikörperbildung angeregt worden sind. Es dürfte hier aber kein zentraler Ausfall der Antikörperbildung, sondern eine Hemmung der Antikörperabgabe vorliegen, die durch einen intrazellulären Abbau schon gebildeter Antikörper hervorgerufen wird.

Während in der bisherigen, auf diesem Gebiet noch spärlichen Literatur, die Autoren bei der Immunparalyse - wobei dieser Ausdruck leider nicht bei allen die gleiche Bedeutung hat, da die Begriffe Immuntoleranz und Immunparalyse nicht deutlich getrennt werden - mit parenteralen Antigeninjektionen arbeiteten, habe ich mir zur Aufgabe gestellt, die eventuelle Immunparalyse durch orale Impfstoffgaben zu erreichen.
Da es sich bei der oralen Impfung zunächst um eine lokale Immunisierung, nämlich der Schleimhaut des Verdauungstraktes (also entwicklungsgeschichtlich dem Entoderm) handelt, nahm ich an, daß ich wesentlich höhere Dosen an Antigen verabreichen könnte, als dies bei der parenteralen Impfung möglich ist. Es ist

ja bekannt, daß es bei der parenteralen Impfung bei Zufuhr von höheren Antigenmengen durch massives Freiwerden von Toxinen häufig sofort zu schwerer Schädigung des Makroorganismus kommt.

Wenn diese Theorie stimmt, daß, wie oben beschrieben, den Tieren ohne Risiko für ihre Gesundheit oral eine sehr hohe Antigendosis verabfolgt werden kann, müßte sich, sofern dies überhaupt eintritt, eine Immunparalyse statistisch besonders leicht durch die wieder ansteigende Mortalität der mit höheren Dosen geimpften Tiere im Vergleich zu denen, die eine normale Impfdosis erhalten haben, nachweisen lassen.

E. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Zunächst mußte geklärt werden, ob die Tiere überhaupt höhere Dosen an Antigenen ohne eine allgemein schädigende Wirkung vertragen würden. Daher führte ich zuerst drei Vorversuche durch, die meine Theorie bestätigten, daß die Tiere (NMRI-Mäuse) ohne Schwierigkeiten die von mir geplanten Dosen an Antigenen vertrugen. Ich konnte weder eine erhöhte Mortalität bei höheren Dosen noch sonst irgendeine Schädigung der Tiere erkennen. Auch machten die Tiere während der 14tägigen Impfstoffgabe keinen kranken Eindruck (normale Nahrungsaufnahme, normaler Bewegungsablauf). Weiterhin konnte ich in diesen Vorversuchen bestätigen, daß die orale Impfung mit 10^9 Keimen/ml einen statistisch beweisbaren Impfschutz gegenüber den ungeimpften Kontrolltieren ergibt. Da dies durch die Versuche von RAETTIG (2o,21,22) für die Verdünnung 10^9 Keime/ml schon hinreichend beschrieben und bekannt war, ließ ich bei den folgenden Hauptversuchen die Immunisierung der Tiere mit dieser Verdünnung fallen.

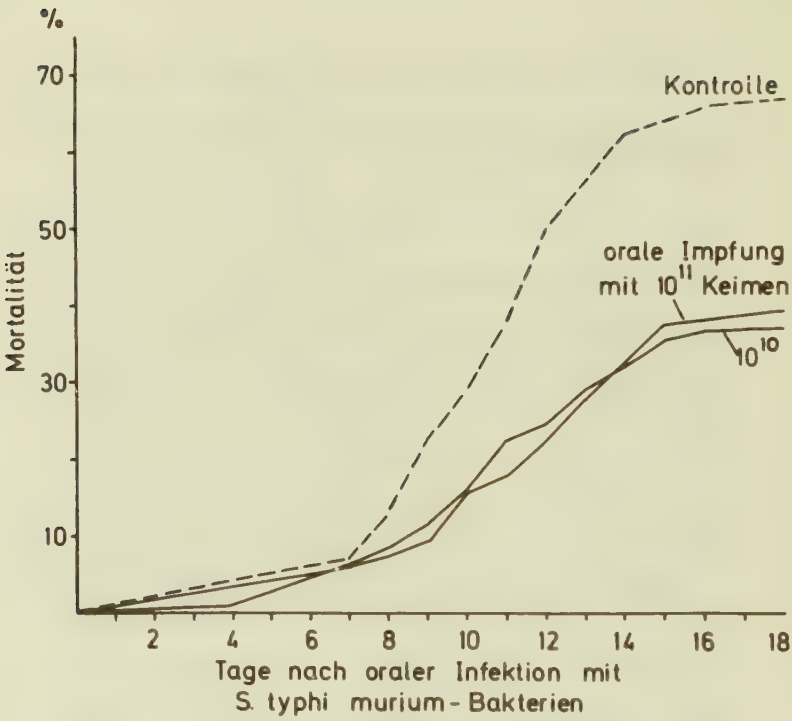
%
70
50
30
10
Mortalität
Kontroile
orale Impfung
mit 10^{11} Keimen
10^{10}
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Tage nach oraler Infektion mit
S. typhi murium - Bakterien

Abbildung 1

Bei den ersten beiden Hauptversuchen immunisierte ich mit einer Dosis von 10^{10} und 10^{11} Keimen/ml. Jeweils wurden mit jeder Verdünnung etwa 50 Tiere geimpft; etwa 50 nichtgeimpfte Mäuse pro Versuch bildeten die Kontrolle. Wie die Abbildung 1 zeigt, in der die beiden ersten Versuche zusammengefaßt sind, ergab sich für die höher immunisierten Tiere ein signifikanter, statistisch beweisbarer Impfschutz gegenüber den Kontrolltieren. Bei der Infektion, der vorher mit einer Dosis von 10^{10} Keimen/ml geimpften Mäuse, erhielt ich eine Endmortalität von 38,5 % ; bei den mit 10^{11} Keimen/ml geimpften Tieren eine solche von 36,0 %. Im Vergleich hierzu lag die Mortalität bei den Kontrolltieren bei 66,0 %.

Versuch		Orale Impfung mit ..... Keimen/ml								nicht geimpfte Kontroll-Mäuse		
		10^{10}			10^{11}			10^{12}				
Nr.	n	+	%	n	+	%	n	+	%	n	+	%
1	44	20	45,4	47	26	55,3				50	36	72,0
2	49	14	29,6	49	11	28,6				56	34	60,7
3	49	21	42,8	49	17	34,7	40	12	31,6	59	48	81,4
4	56	20	35,7	54	13	24,1	43	15	36,6	52	29	55,8
5	54	13	24,1	49	21	42,9	46	9	22,5	55	22	40,0
Summa	252	88	34,5	248	88	35,5	129	36	27,9	272	169	62,1

Tabelle I: Zusammenfassung der Hauptversuche
(n = Anzahl der Mäuse im Versuch;
+ = davon gestorbene Mäuse;
% = Endmortalität)

Bei den folgenden Versuchen nahm ich nun noch eine weitere Konzentration mit 10^{12} Keimen/ml Impfflüssigkeit hinzu. Bei dieser Verdünnung erhält man schon eine dickliche, sämige Flüssigkeit, die von den Mäusen aus physikalischen Gründen gerade noch aufgenommen werden kann. Daher gab ich diese Dosis in drei Einzelgaben jeweils über die einzelnen Impftage verteilt. - Eine weitere Konzentration der Keime auf 10^{13} pro Milliliter ist daher aus den eben genannten Gründen nicht möglich.

Wie die Tabelle I und die Abbildung 2 zeigen, änderten sich die Ergebnisse für die mit 10^{10} und 10^{11} Keimen/ml geimpften Tiere nur unwesentlich. Ich erhielt bei 10^{10} Keimen eine Endmortalität von 34,5 %, bei 10^{11} Keimen/ml eine von 35,5 % und bei 10^{12} Keimen/ml eine von 27,9 %. Demgegenüber betrug die Endmortalität der Kontrollmäuse 62,1 %.

In der Tabelle II habe ich die statistische Sicherung (nach KOLLER) der Endmortalität eingetragen(12), indem ich die größtzulässige Zufallsdifferenz Dz der beobachteten Differenz zwischen den Mortalitätswerten Db gegenübergestellt und den Grad der statistischen Echtheit der Differenz E durch den Quotienten Db : Dz gekennzeichnet habe. Da dieser Wert bei allen Keimzahlenverdünnun-

gen über 1 liegt, ist also der Unterschied zwischen der Mortalität der geimpften - und der nichtgeimpften - (Kontroll) Tiere gesichert.

Impf-dosis	Anzahl der Mäuse	davon gestorben abs.	%	Wirkungs-index	Beobachtete Differenz Db	Größtzulässige Zufallsdifferenz Dz	Echtheit der Differenz E = Db : Dz
10^{10}	252	88	34,5	44,4	27,6 %	13,4 %	2,06
10^{11}	248	88	35,5	42,8	26,6 %	13,5 %	1,97
10^{12}	129	36	27,9	55,1	34,2 %	15,8 %	2,16
Ktr.	272	169	62,1	----	----	----	----

Tabelle II: Zusammenfassung und statistische Sicherung der Versuchsergebnisse

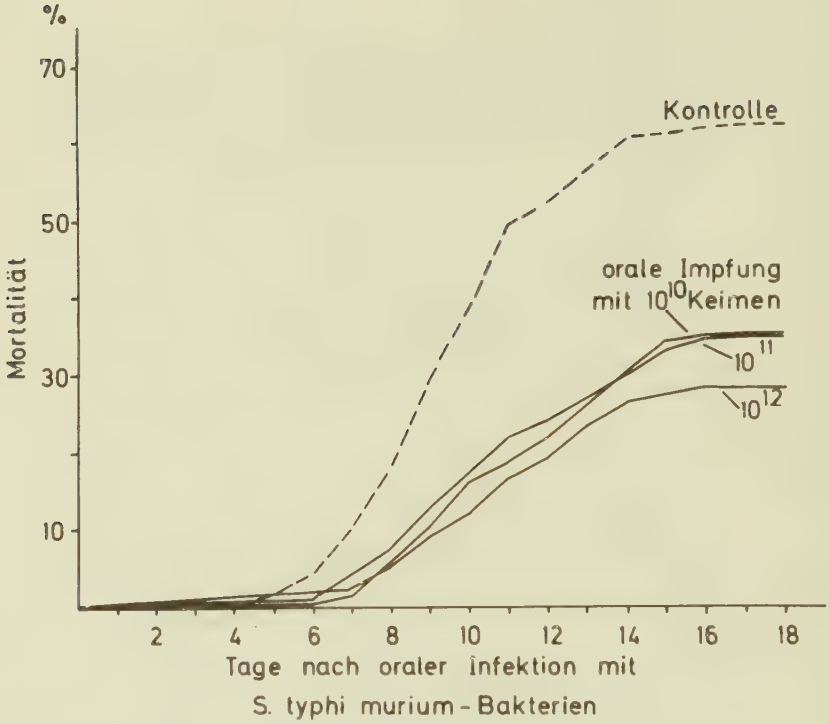
%
70
50
30
10
Mortalität
Kontrolle
orale Impfung
mit 10^{10} Keimen
10^{11}
10^{12}
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Tage nach oraler Infektion mit
S. typhi murium - Bakterien

Abbildung 2

F. DISKUSSION

Wie die Tabelle II zeigt, in der alle Versuche zusammengefaßt sind, besteht bei allen drei Verdünnungen (10^{10} bis 10^{12} Keime/ml) eine etwa gleich hohe Immunität gegenüber den ungeimpften Kontrolltieren. Sie entspricht in etwa den von RAETTIG ermittelten Schutzwerten bei der Impfdosis 10^{9} Keime/ml (2o). Man könnte sogar eher noch von einer höheren Immunität bei der Verdünnung 10^{12} Keime/ml - Wirkungsindex 55,1 - gegenüber denen von 10^{9} - Wirkungsindex 47,9 - (20) bzw. 10^{10} und 10^{11} Keime/ml - Wirkungsindex 44,4 bzw. 42,8 - sprechen, jedoch sind diese Unterschiede so gering, daß sie statistisch nicht echt sind.
Auf keinen Fall ist jedoch bei dieser Versuchsanordnung auch nur der geringste Anhalt für eine Immunparalyse gegeben. Im Gegenteil haben die Versuche eindeutig gezeigt, daß keine Immunparalyse auch bei höchstmöglichen oralen Antigenmengen zu erzielen ist.

Da unsere Mäuse etwa 20 g wiegen, das Durchschnittsgewicht eines Menschen aber mit etwa 70,0 kg angegeben wird, entspräche die oben erwähnte Dosis von 10^{12} Kei-

men/ml einer Dosis beim Menschen, umgerechnet auf das Körpergewicht, von $3,5 \times 10^{15}$, und diese Dosis müßte 10 mal gegeben werden (25).
Diese Versuche lassen vermuten, daß auch beim Menschen kaum eine Gefahr besteht, durch Überdosierung eines oralen Impfstoffes eine verminderte Immunität zu erzeugen. Hierzu weise ich vergleichend auf die Ergebnisse bei Immunisierung mit geringeren Keimzahlen von RAETTIG (22) hin.

Weiterhin ist bewiesen, daß Tiere ohne Gefahr für ihr Leben bzw. eine körperliche Schädigung erstaunlich große Keimdosen oral aufnehmen können. Es tritt also keine Reaktion durch freiwerdendes Toxin, wie bei parenteralen Gaben, auf.

Zu der von RAETTIG aufgeworfenen Frage (20), ob es sich bei der 3.Phase der Epidemiekurve, die ja im Gegensatz zu der eigentlich zu erwartenden Summenkurve nach Gauß für die obige Versuchsanordnung typisch ist, um einen immunparalytischen Vorgang handelt, ist also zu verneinen. Wahrscheinlich handelt es sich eher, wie ebenfalls von RAETTIG angenommen, um eine dauernde orale Eigenimmunisierung der infizierten Kontrolltiere durch Kontakt mit dem Erreger und seinem Antigen während der Länge der Versuche, so daß der Immunitätsvorsprung

der geimpften Tiere langsam aufgeholt wird.

Zur Frage, ob unter gewissen Bedingungen (5,6,7, 17,18) durch kleinste Einzelgaben von Antigenen, über längere Zeit verabfolgt, doch noch eine Immunparalyse oral zu erreichen ist, ist zu bedenken, daß sich unser Versuchstier - die Maus - für diese Prüfungen schlecht eignet. In Anlehnung an die oben erwähnten Versuche müßte sich allein der Immunisierungszeitraum bei der einzelnen Maus über etwa 6 Wochen erstrecken. In dieser Zeit würde aber die natürliche Resistenz der Mäuse gegenüber der oralen Infektion mit S.typhi murium-Bakterien so zugenommen haben, daß ein oraler Infektionsversuch nicht mehr möglich ist.

G. ZUSAMMENFASSUNG

Es sollte gezeigt werden, ob eine Immunparalyse bei oraler Impfung von Mäusen mit abgetöteten Erregern von Salmonella typhi murium in sehr hohen Dosen möglich ist. Zu dem Zwecke hatte ich in zehn Einzelgaben an zehn Tagen mit der 10, 100 und 1000fachen Dosis der normalen Immunisierungsmenge gearbeitet.

Alle Einzelversuche wie auch die Zusammenfassung aller Versuche zeigten - statistisch gesichert -, daß es unter diesen Bedingungen zu keiner Immunparalyse bei Mäusen kommt, vielmehr bei den einzelnen Impfkonzentrationen von 10^{10}, 10^{11} und 10^{12} Keimen/ml ein deutlicher, etwa gleich großer Impfschutz besteht, wie etwa bei der normalen Impfdosis von 10^{9} Keimen/ml bei nachfolgender oraler Infektion.

So konnte die in der Literatur gelegentlich geäußerte Vermutung, daß es bei oraler Antigenzufuhr zu keiner Immunparalyse kommt, an Hand meiner Versuche bestätigt werden.

H. LITERATUR

1. BROCKE, M.S.
Conversion of Immunological Paralysis to Immunity by Endotoxin
Nature 206, 635-36 (1965)

2. CLAMAN, H.N.
Tolerance to a protein antigen in adult mice and the effect of non-specific-factors,
J. Immunol., 91, 833 (1963)

3. DOWDEN, St.J. und SERCARZ, E.E.
II. The Effect of Antigen on Spontaneous Escape from Immune Paralysis
J. Immunol., 98, 827-35 (1967)

4. DRESSER, D.W.
Specific inhibition of antibody production.
I. Protein - overloading paralysis.
Immunology, 5, 161 (1962a)

5. Specific inhibition of antibody production.
II. Paralysis induced in mice by small quantities of protein antigen.
Immunology, 5, 378 (1962b)

6. Specific inhibition of antibody production.
III. Apparent changes in the half-life of bovine gamma-globulin in paralysed mice.
Immunology, 6, 345 (1963)

7. DRESSER, D.W. und GOWLAND, G.
Immunological paralysis induced in adult rabbits by small amounts of a protein antigen.
Nature (Lond.), 203, 733 (1964)

8. EHRLICH, P.

Experimentelle Untersuchungen über Immunität
I. über Ricin
II. über Abrin
Dtsch. med. Wschr. 976 + 1218 (1891)

9. FELTON, L.D.; OTTINGER, B.

Pneumococcus Polysaccharid as a paralyzing agen on the Mechanism of Immunity in white mice
J. Bact. 43, 94 (1942)

10. FELTON, L.D.; PRESCOTT, B.; KAUFMAN, G. und OTTINGER, B.

Studies on mechanism of immunological paralysis induced inmice by pneumococcal polysaccharides.
J. Immunolog., 74, 17 (1955)

11. KERMAN, R.; SEGRE, D.; MYERS, W.L.

Altered Response to Pneumococcal Polysaccharide in Offspring of Immunologically Paralyzed Mice Science 156, 1514-16 (1967)

12. KOLLER, S.

Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.
Dresden 1943

13. KORDES, B.

Orale Immunisierung von Mäusen mit Impfstoffen aus physikalisch inaktivierten S.typhi murium Bakterien
Diss. 1969 F.U. Berlin

14. LIETZ, B. und RAETTIG, H.

Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
5. Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoli-Infektionen
Zbl. Bakt. I. Orig. 204, 543-554 (1967)

15. MATANGKASOMBUT, P. u.a.
Ablauf bei Mäusen mit Pneumococcen -Polysaccharid
I. Immunolog. 100, 845-5o (1968)

16. MEDAWAR
Folia biol. Prag, 7, 1 (1961)

17. MITCHISON, N.A.
Induction of immunological paralysis in two zones of dosage.
Poc. roy. Soc., B. 161, 275 (1964)

18. Recovery from immunological paralysis in relation to age and residual antigen.
Immunology, 9, 129 (1965)

19. NAKAMURA, R.M. und WEIGLE, W.O.
Induction, Maintenance and termination of immunologic unrespensiveness to bovine thyroglobilin in rabbits
J. Immunolog, 99, 357-64 (1967)

20. RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
1.Mitteilung: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion
Zbl. Bakt. I. Orig. 193, 398-410 (1964)

21. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
2. Mitteilung: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus
Zbl. Bakt. I. Orig. 197, 368-388 (1965)

22. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
3. Mitteilung: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis
Zbl. Bakt. I. Orig. 2o3, 478-491 (1967)

23. RAETTIG, H.

Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen 4. Mitteilung: Serumantikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis
Zbl. Bakt. I. Orig. 2o4, 221-231 (1967)

24. RAETTIG, H. und BUSE, A.

Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen 10. Mitteilung: Serologische Primär-und Sekundärantwort nach oraler Impfung mit S.typhimurium-Vollantigen im vergleichendem Tierexperiment
Zbl. Bakt. I. Orig. 214, 216-23o (1970)

25. RAETTIG, H.

Empfehlenswerte Immunprophylaxe gegen bakterielle Darmerkrankungen
Ztschr. für ärztliche Fortbildung, 56. Jahrgang, Heft 7 (1967)

26. STEFFEN, C.

Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie
Thieme Verlag Suttgart 1968

27. TOPLEY, W.W.C.

Experimental epidemiology
Lancet 1, 531 (1926)
Lancet I, 645 (1926)

28. WEIGLE, W.O. und HIGH, G.J.

The Effect of antigenic competition on antibody production to heteralogous proteins, termination of immunologie unresponsiveness and induction of autoimmunity
J. Immunol., 99, 392-98 (1967)

Herrn Professor Dr. med. Hansjürgen R A E T T I (
möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für die Mühe und die wertvollen Hinweise, die er der Arbeit angedeihen ließ, besonders danken.
Weiterhin danke ich Frau Dean für ihre Assistenz bei den Tierversuchen und der Herstellung der Impfstoffe, sowie Frau Kronenberg für ihre Mithilfe bei der Beschaffung der Literatur.

LEBENSLAUF
==========

Am 11.9.1934 wurde ich als Sohn des Prokuristen Fritz Kohlschmidt und seiner Ehefrau Wally, geb. Hartwich, in Berlin geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich neun Jahre lang die Georg Herwegh- bzw. Diesterweg-Oberschule in Berlin und legte dort 1954 die Reifeprüfung ab. Zum Sommersemester 1954 wurde ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. 1956 bestand ich dort das Physikum und am 3.3.1960 das Staatsexamen.
Während meiner Medizinalassistentenzeit arbeitete ich zehn Monate auf der Inneren-Abteilung des Städt. Krankenhauses Tegel-Süd, dann zwei Monate im Gesundheitsamt Reinickendorf von Berlin in der Schul- und Säuglingsfürsorge sowie in der Abteilung für Lebensmittelhygiene. Darauf folgten acht Monate auf der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung der Freien Universität Berlin in der Städt. Frauenklinik Charlottenburg und zuletzt vier Monate auf der Chirurgischen Abteilung des Städt. Humboldt-Krankenhauses in Berlin-Reinickendorf. Hier war ich auch als Assistenzarzt bzw. Stationsarzt auf der Chirurgischen Abteilung und in der Anaesthesie bis zum 31.3.1964 tätig.

In dieser Zeit heiratete ich 1962 die Ärztin Dr. Ingrid Kohlschmidt, geb. Kaminsky. Aus der Ehe gingen im März 1964 ein Sohn und im September 1965 eine Tochter hervor.

Am 1.1.1964 ließ ich mich in Berlin-Wilmersdorf in der Pariser Straße als praktischer Arzt nieder. Diese Praxis verlegte ich am 1.10.1969 wegen der für den praktischen Arzt wesentlich interessanteren Tätigkeit auf dem Lande, und wegen unserer Kinder, nach Immenreuth in der Oberpfalz, wo ich nun gemeinsam mit meiner Frau eine Landpraxis führe.